

QIAamp[®] MinElute[™] Virus Vacuum Kit

プロトコールとトラブルシューティング

血漿、血清、無細胞体液からのウィルスRNAおよびDNAの同時精製

目次

	ページ
QIAamp MinElute Virus Vacuum プロトコール	2
トラブルシューティングガイド	4

November 2002



QIAamp MinElute Virus Vacuum プロトコール

500 µl の血漿および血清サンプルからのウィルス核酸分離

実験を始める前の重要事項

- サンプルを室温 (15 ~ 25 °C) に戻します。
- ステップ14 で使用する溶出用 Buffer AVE を室温に戻します。
- ステップ4 で使用するヒートブロックを 56 °C に設定します。
- 英語版 Handbook 19 ~ 21 ページの説明にしたがって Buffer AW1、Buffer AW2、QIAGEN Protease を調製したことを確認します。
- 英語版 Handbook 20 ページの説明にしたがって Buffer AVE に溶解調製したキャリア RNA を Buffer AL に添加します。
- すべての遠心ステップは室温で行います。
- VacConnector と VacValve を用いた操作では、英語版 Handbook 14 ~ 16 ページに記載されているように QIAvac 24 をセットアップします。

1. 75 µl の QIAGEN Protease を 2 ml のマイクロ遠心チューブ (別売) にピペットで入れる。
2. 2 ml マイクロ遠心チューブに 500 µl の血漿あるいは血清を加える。
3. 500 µl の Buffer AL (11.2 µg/ml のキャリア RNA を含む) を加える。蓋を閉めて、ボルテックスで 15 秒間混和する。

効率的な溶解を確実に行うためには、サンプルと Buffer AL を完全に混和し、均一な溶液にすることが必須です。

注：QIAGEN Protease を直接 Buffer AL に加えないでください。

4. 56 °C で 15 分間インキュベートする。
5. 簡単な遠心操作を行いチューブの蓋の内側についたサンプルを集める。
6. 600 µl のエタノール (96 ~ 100 %) をサンプルに加え、蓋を閉めて、ボルテックスで 15 秒間完全に混和する。エタノールを加えたライセートを室温 (15 ~ 25 °C) で 5 分間インキュベートする。

注：室温が 25 °C を超える場合には、ライセートに添加する前にエタノールを氷上で冷やしてください。

7. 簡単な遠心操作を行いチューブの蓋の内側についたサンプルを集める。
8. QIAamp MinElute Column を QIAvac 24 上の VacConnector にセットする。QIAamp MinElute Column を開いて、extension tube をセットする。
注：ステップ 13 の乾燥のための遠心操作用にマイクロ遠心チューブを取っておいてください。
9. ステップ 7 のライセート全量を QIAamp MinElute Column にセットした extension tube に静かにアプライする。真空ポンプのスイッチを入れる。ライセートすべ

てがMinElute Columnを通過後、真空ポンプのスイッチを切り圧力を0 mbarにもどす。

他のすべてのMinElute ColumnのVacValveが閉じられているにもかかわらず、個々のサンプルのライセートがメンブレンを完全に通過しない場合には、QIAamp MinElute Columnを新しい2 ml コレクションチューブ（別売）にセットし、蓋を閉め、3 分間あるいはライセートが完全にカラムを通過するまで最高速度で遠心します。コレクションチューブは別途購入が可能です。

注：迅速かつ簡便に吸引力を解除するためにはVacuum Regulatorをご使用下さい（英語版Handbook30ページのOrdering Information参照）。

10. 600 μ lのBuffer AW1をQIAamp MinElute Columnにアプライする。真空ポンプのスイッチを入れる前に、extension tubeを取り外して捨てる。Buffer AW1が完全にMinElute Columnを通過した後、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を0 mbarにする。

注：クロスコンタミを避けるために、extension tubeを除去する際に、近接したQIAamp MinElute Columnに接触しないように気をつけます。

11. QIAamp MinElute Columnに750 μ lのBuffer AW2を添加する。カラムの蓋を開けて、真空ポンプのスイッチを入れる。Buffer AW2が完全にMinElute Columnを通過した後、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を0 mbarにする。
12. QIAamp MinElute Columnに750 μ lのエタノール（96～100%）をアプライする。カラムの蓋を開けて、真空ポンプのスイッチを入れる。エタノールがカラムを完全に通過した後、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を0 mbarにする。
13. QIAamp MinElute Columnの蓋を閉める。吸引装置からカラムを取り外し、VacConnectorを捨てる。ステップ8で取っておいた2 mlのマイクロ遠心チューブにQIAamp MinElute Columnをセットし、メンブレンが完全に乾燥するまで、最高速度（20,000 \times g；14,000 rpm）で3分間遠心操作する。
14. QIAamp MinElute Columnを新しい1.5 mlマイクロ遠心チューブ（添付）にセットし、ろ過液を含んだコレクションチューブを捨てる。QIAamp MinElute Columnの蓋を静かに開けて、20～150 μ lのBuffer AVEあるいはRNase フリー水をメンブレンの中央にアプライする。蓋を閉めて室温で1分間インキュベートする。最高速度（20,000 \times g；14,000 rpm）で1分間遠心操作する。

重要： 溶出バッファーを室温に戻したことを確認します。少量で溶出を行う場合は（50 μ l以下）、溶出バッファーをメンブレンの中央にアプライし、カラムに結合したRNAおよびDNAが完全に溶出されるようにします。

溶出バッファーの量はフレキシブルで、ダウンストリームのアプリケーションでの必要性に応じて調節可能です。再回収される溶出液量は、カラムにアプライした溶出バッファーよりも約5 μ l少なくなります。

Buffer AVEあるいは水をアプライしたQIAamp MinElute Columnを、遠心操作の前に5分間室温でインキュベートすると、DNAとRNA収量は一般に増加します。

トラブルシューティングガイド

コメントと提案

溶出液に核酸が少ない、あるいはほとんどない

- a) キャリアRNAをBuffer ALに
添加していない
- Buffer AVEでキャリアRNAを調製後、Buffer ALに混和する（英語版Handbook20ページ）。新しいサンプルで精製操作をやり直す。
- b) キャリアRNAが分解
- Buffer AVEで調製したキャリアRNAを-20℃で保存しなかった、あるいは凍結・解凍を繰り返した。あるいはBuffer AL・キャリアRNA混和物を2～8℃で48時間以上保存した。Buffer AVEに溶解したキャリアRNAの新しいチューブを準備し、Buffer ALと混和する。新しいサンプルで精製操作をやり直す。
- c) Buffer AL・キャリアRNA
混合物の混和が不十分
- Buffer ALとキャリアRNAの入ったチューブを少なくとも10回静かに上下に転倒させて混和する。
- d) 96～100%エタノールではなく
低濃度のものを使用
- 新しいサンプルと96～100%エタノールで精製操作をやり直す。
- e) RNAが分解
- スタートサンプルでRNAが分解されていないかチェックする。スタートサンプル（血漿、血清、体液）中のRNaseによりRNAが分解されることがある。採集直後のサンプル、あるいは冷凍/冷蔵保存したサンプルをすぐに調製したことを確認する。バッファあるいは水中にRNaseコンタミがないことをチェックし、操作中にRNaseが作用していないことを確認する。
- f) Buffer AVE中にRNase
がコンタミ
- AVEチューブを繰り返し使用する場合、RNaseのコンタミに注意する。RNaseがコンタミした場合には、Buffer AVEを新しいものに換える。新しいサンプルで精製操作をやり直す。
- g) Buffer AW1 あるいはAW2が
正しく調製されていない
- 濃縮 Buffer AW1 あるいはAW2が正確な量の96～100%エタノールで希釈されていることを確認。新しいサンプルで精製操作をやり直す。
- h) Buffer AW1 あるいはAW2を
70%エタノールで調製
- 濃縮 Buffer AW1 あるいはAW2を96～100%エタノールで希釈したことを確認。新しいサンプルで精製操作をやり直す。

コメントと提案

RNA/DNAを用いたダウンストリームの酵素反応でよい結果が得られない

- a) 溶出液中にRNAがほとんどあるいはまったくない “溶出液中に核酸が少ないあるいはまったくない”の項で原因を調べる。可能なら、反応液に添加する溶出液の量を増やす。
- b) サンプルの凍結/解凍を何度も繰り返した 凍結/解凍を繰り返さない（英語版Handbook19ページ参照）。常に新鮮なサンプルあるいは一回のみ解凍したサンプルを使用する。
- c) サンプル中のウイルス濃度が低い サンプルを長期間、室温で放置した。新しいサンプルで精製操作をやり直す。
- d) Buffer AL中でサンプルが十分に溶解されていない QIAGEN Proteaseを長時間、高温で使用した。新しいサンプルと新しいQIAGEN Proteaseで精製操作をやり直す。
- e) 溶出液中のキャリアRNA量が多すぎるあるいは少なすぎる 増幅反応に最適なキャリアRNAの最大量を決める。それにしたがって、添加するキャリアRNAの濃度を調節する（英語版Handbook20ページの“Addition of carrier RNA to Buffer AL”を参照）。
- f) 感度が低下 増幅反応に最適な溶出液の最大量を決める。それにしたがって、増幅反応に加える溶出液量を増やすか減らす。溶出液の量は比例して調節する。
- g) ダウンストリーム・アッセイでの精製核酸のパフォーマンスが、洗浄バッファの調製後の経過日数と共に変動 洗浄用Buffer AW1、Buffer AW2の塩分およびエタノール成分が、次の実験まで長期間放置されたために分離した。各調製前に、バッファを完全に混和する。
- h) 逆転写酵素とTaq DNAポリメラーゼの新しい組み合わせ 酵素を変更した場合には、Buffer ALに添加するキャリアRNAと溶出液の量を再調整することが必要。

一般的な操作

- a) QIAamp MinElute Columnの目詰まり
- QIAamp MinElute Columnを吸引装置からはずし、2 mlのコレクションチューブにセットし、サンプルが完全にメンブレンを通過するまで遠心操作する。
- 凍結／解凍を繰り返したことにより、血漿中の寒冷沈降物が生じることがある。これは、QIAamp MinElute Columnをブロックする。血漿の凍結／解凍を1回以上繰り返さない。
- 寒冷沈降物が観察される場合には、英語版Handbook 19ページの“Sample storage”に記述されているように、遠心操作によりサンプルを清澄化する。
- b) 溶出液量が変動する
- 異なるサンプルタイプを処理した。
- c) 吸引力が800～900 mbarに達していない。
- 吸引装置が完全に閉まっていない。真空ポンプのスイッチを入れた後、吸引装置の蓋を押す。吸引力が目的値に達していることを確認する。
- QIAvac 蓋のガスケットが劣化している。吸引装置のシールをチェックして、必要な場合には交換する。
- VacValve に欠陥がある。VacValve をすべて外して VacConnector を luer extension に直接挿入し、そこに QIAamp MinElute Column をセットする。カラムの蓋を閉めて真空ポンプのスイッチを入れる。吸引力が目的値に達していることをチェックする。必要な場合には VacValve を交換する。
- 真空ポンプへの連結部で漏れがる。Luer cap のついた luer extension をすべて閉じる。ポンプのスイッチを入れた後（かつ Vacuum Regulator /バルブを閉じた後）吸引力が安定しているかチェックする。必要な場合にはポンプと真空吸引装置の連結部を交換する。
- 上記すべてをチェックした後、強力な真空ポンプと交換する。

— Memo —

株式会社 キアゲン

〒104-0054 東京都中央区勝どき3-13-1 Forefront Tower II

Tel: 03-6890-7300

Fax: 03-5547-0818

E-mail: techservice@jp.qiagen.com (2003年1月からtechservice-jp@qiagen.com
に変更になります)

www.qiagen.co.jp

